

Rendiconti Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL *Memorie di Scienze Fisiche e Naturali* 124° (2006), Vol. XXX, P. II, pp. 125-154

MASSIMO ANGELONE* – GIOVANNA ARMIENTO* CARLO CREMISINI* – FABIO SPAZIANI* – ANNA ROSA SPROCATI* CHIARA ALISI*

La contaminazione dei suoli da "metalli pesanti": problemi emergenti, nuovi approcci di studio e prospettive nell'analisi strumentale in campo

Riassunto - La contaminazione da metalli pesanti nel suolo è principalmente causata da attività industriali, minerarie e, in particolare nei centri urbani, dal traffico veicolare.

Comunque, sebbene i suoli urbani siano soggetti a questo tipo di contaminazione, basti pensare, in un recente passato, all'arricchimento in piombo conseguente all'utilizzo dei carburanti per autoveicoli, sono però altri i siti in cui il problema si manifesta nel modo più evidente. I suoli situati in aree minerarie, infatti, possono presentare concentrazioni in metalli particolarmente elevate, derivanti dai rifiuti delle attività estrattive. L'Italia, in quanto paese ricco di siti minerari, attivi o dismessi, è quindi interessato a questa forma di contaminazione.

La caratterizzazione ambientale dei siti minerari necessita di un approccio interdisciplinare, poiché il fenomeno di mobilizzazione dei metalli pesanti, che porta alla loro diffusione e circolazione, con conseguente rischio per l'ambiente e per l'uomo, è legato a fattori mineralogici, chimico-fisici e biologici. Nel presente lavoro verranno quindi discussi tutti questi aspetti, applicati alle tipiche fasi di studio su un sito contaminato: esplorazione/monitoraggio del sito; valutazione geochimica della mobilità dei metalli; tecniche di recupero.

1. INTRODUZIONE

Il problema della contaminazione dei suoli da metalli pesanti ha ricevuto negli ultimi vent'anni una crescente attenzione, sia dal punto di vista scientifico che da quello degli approcci normativi e metodologici volti alla sua soluzione. D'altra parte, il problema ha avuto una notevole evoluzione strettamente legata allo sviluppo tecnologico ed allo sfruttamento delle risorse ambientali da parte dell'uomo. Non a caso, infatti, gli ambienti maggiormente interessati dalla contaminazione da

* ENEA ACS-CHIM, Dipartimento Ambiente, Cambiamenti Globali e Sviluppo Sostenibile - CR Casaccia, Via Anguillarese 301, 00123 Roma. E-mail: angelone@casaccia.enea.it metalli pesanti sono, per certi aspetti, gli ecosistemi urbani e, soprattutto, i siti dove si concentrano le attività estrattive ed industriali.

Il legame fra evoluzione tecnologica ed inquinamento è evidente. A titolo di esempio basta citare le problematiche legate al massiccio utilizzo delle automobili e, in particolare, al problema ambientale della contaminazione da piombo (iniziato in America a partire dal 1926, con l'adozione del piombo-tetraetile come additivo antidetonante nei carburanti). L'introduzione della "benzina verde", associata all'installazione della "marmitta catalitica" sugli autoveicoli, ha permesso di imporre una drastica riduzione all'inquinamento del suolo da parte del piombo, ma ha contemporaneamente dato inizio alla contaminazione da platinoidi. Questo nome indica un gruppo di sei elementi (platino, palladio, rodio, iridio, rutenio ed osmio), naturalmente presenti nei suoli nell'ordine di frazioni di ng/g, divenuti estremamente attuali dal punto di vista ambientale. Tre platinoidi (il platino, il palladio ed il rodio) sono, infatti, presenti all'interno della marmitta catalitica, in quantità variabili da pochi milligrammi a qualche grammo, poiché agiscono come promotori delle reazioni chimiche che abbattono i gas inquinanti prodotti dalla combustione del carburante; tuttavia, l'inevitabile usura del dispositivo catalitico porta al graduale rilascio di particolato ricco in platinoidi che, attraverso alcuni cicli di deposizione e risospensione, può entrare in contatto con numerose matrici ambientali e, attraverso la respirazione, può penetrare nell'organismo umano. Nonostante il relativo breve lasso di tempo intercorso dall'introduzione dei dispositivi catalitici (adottati in Italia dai primi anni 90) i suoli delle aree urbane e quelli lungo le principali vie di comunicazione (come era già accaduto per il piombo) evidenziano già, sia pur lievi, anomalie nei livelli dei platinoidi (Cinti et al., 2002).

La contaminazione da metalli pesanti non è tuttavia circoscritta unicamente alle aree urbane e/o antropizzate, ma, come nel caso delle miniere abbandonate, può coinvolgere anche aree lontane dagli insediamenti e collegarsi allo sfruttamento delle risorse naturali. Le attività estrattive nelle zone minerarie, infatti, producono rifiuti estremamente ricchi in "metalli pesanti", che in seguito all'interazione con gli agenti atmosferici possono essere mobilizzati, portati in soluzione nelle acque, e distribuiti tra i comparti ambientali. Per avere un'idea dell'entità degli scarti delle lavorazioni minerarie, occorre ad esempio ricordare che nell'estrazione del rame il rapporto fra "prodotto estratto commerciabile" e "materiale trattato" è di circa 1:420, mentre il contenuto medio tipico di rame nel minerale lavorato è dello 0.6%. Negli anni '90 solo nelle miniere di rame di Bingham (Utah, USA) venivano lavorate circa 225 t al giorno di roccia, di cui solo il 20% costituito dal minerale ricercato.

La mobilità dei metalli nelle aree minerarie (da cui dipende la possibilità del loro trasferimento dal suolo alle acque, alle piante, agli animali) è il risultato di un complesso sistema di reazioni geochimiche e biochimiche (mediate da microrganismi) che prende il via con la formazione di acque ad elevata acidità (drenaggi acidi di miniera) e culmina con la dissoluzione dei metalli; quest'ultimi permarranno in soluzione in funzione dei delicati equilibri (pH, red-ox, ecc.) che ne governano la precipitazione, l'adsorbimento e la ridissoluzione. I suoli situati in prossimità dei siti minerari sono generalmente caratterizzati da elevate concentrazioni di metalli, generalmente catalogati come "tossici" (tabella 1), da una riduzione sensibile dei valori del pH e da un bassissimo tenore di carbonio organico. Da questo deriva, di solito, una riduzione della biodiversità microbica del suolo ed una conseguente perdita di fertilità. Le aree minerarie abbandonate ed in disuso costituiscono quindi dei siti potenzialmente ad alta contaminazione e, come tali, necessitano di adeguate misure di contenimento e monitoraggio. I prossimi paragrafi saranno focalizzati proprio su questa tipologia di aree contaminate, in termini di monitoraggio ambientale e strategie di recupero.

| Elemento | Aree minerarie (mg/kg) | Aree naturali (mg/kg) | | |
|----------|---------------------------|--------------------------|--|--|
| As | Fino a 5000 | 1-15 | | |
| Cd | Fino a 1000 | 0,1-1 | | |
| Cu | Fino a 15000 | 5-40 | | |
| Pb | Fino a 18000 | 5-40 | | |
| Zn | Fino a 20000 | 15-150 | | |
| Bi | Fino a 120 | 0,3-0,5 | | |
| Hg | Fino a 15 | 0,01-1 | | |
| Ni | Fino a 12000 | 2-30 | | |
| Sb | Fino a 40 | 0,1-1 | | |

Tabella 1 - Concentrazione di alcuni elementi in suoli superficiali presso aree minerarie.

2. ASPETTO MULTIDISCIPLINARE DELLO STUDIO DELLA CONTAMINAZIONE DA METALLI PESANTI

Essendo il suolo un complesso sistema "multifase", dove coesistono e interagiscono una componente abiotica ed una componente biotica, lo studio della sua contaminazione richiede necessariamente un approccio di tipo multidisciplinare. In questo modo, infatti, sarà più semplice comprendere i meccanismi che regolano la mobilità dei metalli nel suolo, l'eventuale rischio di contaminazione delle acque in esso circolanti e l'entità del potenziale trasferimento alle piante ed all'uomo.

Un corretto studio multidisciplinare dovrebbe prendere in considerazione almeno i seguenti aspetti:

- mineralogici (da approfondire con tecniche quali DXRD, SEM/EDX, XANES, LIBS, SWIR, LA-ICP-MS);
- geochimici (caratterizzazione chimica, estrazioni sequenziali ed approccio cinetico, rapporti isotopici ecc.);

3. biologici (metabolismo, produzione di LMWCA e fitosiderofori, bioaccumulo e resistenza).

Lo scopo ultimo di un approccio di questo tipo è quello di far confluire le informazioni ottenute dai singoli settori in un piano di "conoscenza", orientato all'impostazione di una "strategia operativa" per la mitigazione del rischio ed all'applicazione di trattamenti per l'eliminazione e/o la riduzione della contaminazione.

Esempi di tecniche di trattamento sono l'aggiunta di ammendanti per il controllo della mobilità dei metalli e la "bioremediation".

L'ENEA già da diverso tempo si occupa dello studio dei suoli inquinati da metalli pesanti e, in particolare, degli aspetti legati alla loro mobilità, sia con un approccio di tipo "geochimico" sia concentrando l'attenzione sulle potenzialità applicative di consorzi batterici appositamente selezionati negli stessi siti contaminati.

In particolare, per quanto riguarda il primo aspetto, verrà di seguito illustrato e discusso un confronto tra le estrazioni sequenziali e lo studio cinetico, descrivendo l'utilità delle informazioni ottenibili con i due metodi. Verrà inoltre illustrata una sperimentazione effettuata nei nostri laboratori (ACS-CHIM), mirata all'uso come ammendanti, su suoli di miniera contaminati da metalli, di "compost" e "fanghi rossi" (residui del processo di estrazione dell'allumina dalla bauxite).

Per quanto riguarda l'approccio biologico descriveremo un'esperienza di studio di alcuni consorzi batterici, isolati in miniere abbandonate, selezionati per la loro resistenza ai metalli pesanti (in particolare lo zinco) e la capacità di bioaccumulo.

Un altro aspetto che verrà discusso sarà relativo all'uso ed allo sviluppo di strumentazione mirata ad indagini in campo (direct analysis and remote sensing), con un cenno particolare al LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTRO-SCOPY (LIBS), tecnica sviluppata anche presso altri laboratori dell'ENEA.

3. Problematiche ambientali legate alla presenza di siti minerari in Italia

Una stima, seppur di larga massima, della superficie del territorio nazionale interessata da attività mineraria (includendo le miniere dimesse), porta ad una percentuale (~0,5%) probabilmente anche superiore a quella valutata per altri paesi; negli USA, infatti, l'attività mineraria interessa circa lo 0,26% del territorio, in Cina lo 0,34%, mentre il valore medio calcolato per l'intera superficie terrestre è 0,20%.

I dati relativi al censimento dei siti minerari italiani abbandonati (APAT, 2006), evidenzia l'esistenza di circa 3000 zone, diffuse praticamente su tutto il territorio nazionale, ma con una concentrazione significativa in cinque regioni: Piemonte, Lombardia, Toscana, Sicilia e Sardegna.

Come precedentemente accennato, dal punto di vista della contaminazione da metalli pesanti le aree minerarie rappresentano dei siti ad elevato rischio, poiché in tali ambienti possono instaurarsi condizioni chimico-fisiche tali da favorire la mobilitazione dei suddetti elementi. Tra i fattori responsabili di questo fenomeno uno dei più frequenti è l'ossidazione dei solfuri, un processo che porta all'acidificazione del sistema ed al conseguente rilascio e circolazione dei metalli. Si deve infatti in massima parte all'ossidazione dei solfuri di ferro, come la pirite (FeS₂) e la pirrotite (Fe_{1-x}S; 0,7<x<1), la formazione dei drenaggi acidi di miniera (Stumm & Morgan, 1981), processo generale che può essere descritto dalla seguente relazione:

$$FeS_2(s) + 7/2 O_2 + H_2O \rightarrow Fe(OH)_3(s) + 2SO_4^{2^-} + 4H^+$$

Anche altri metalli (in traccia) sono presenti comunemente come solfuri, e la loro ossidazione comporta il rilascio del metallo nelle soluzioni circolanti nel suolo (di seguito è rappresentato il caso relativo allo zinco):

$$ZnS(s) + 2O_2(aq) \rightarrow Zn^{2^+}(aq) + SO_4^{2^-}(aq)$$

Una volta in soluzione i metalli possono essere rimossi in vari modi: tramite precipitazione come ossidi, idrossidi o carbonati; per adsorbimento superficiale (ad esempio su ossi-idrossidi di ferro); per coprecipitazione con altre fasi solide. Tuttavia, in soluzioni acide questi processi di rimozione dei metalli sono limitati, per cui la presenza dei drenaggi acidi di miniera favorisce la permanenza dei metalli in soluzione e, di conseguenza, la loro circolazione nell'ambiente.

4. Recenti sviluppi nella strumentazione da laboratorio e da campo per indagini geochimiche ed ambientali.

La caratterizzazione di ambienti contaminati si avvale di innumerevoli tecniche di indagine (geochimiche, geofisiche ecc.) necessarie per acquisire le informazioni utili per la definizione del rischio e la scelta degli interventi di bonifica. Queste tecniche sono utilizzate talvolta in modo sinergico per migliorare la correttezza dell'interpretazione. Poiché le tecniche disponibili sono numerose, non è possibile operare una descrizione sintetica e nel contempo esaustiva; per un quadro completo si rimanda quindi alla copiosa bibliografia esistente. Tuttavia si è convenuto di descrivere quelle ritenute più interessanti per le potenzialità di applicazione attuale e di sviluppo futuro.

La prima, in ordine di esposizione, è una tecnica strumentale di spettroscopia laser, denominata LIBS (acronimo di "Laser Induced Breakdown Spectroscopy") al cui sviluppo ha dato un significativo contributo anche un gruppo di ricerca ENEA (Barbini *et al.*, 1997; Capitelli *et al.*, 2002; Colao *et al.*, 2004). Il nostro laboratorio, invece, ha partecipato alla validazione dei dati ottenuti mediante il confronto con tecniche strumentali "tradizionali" (GFAAS, ICP-MS, ICP-OES). La tecnica LIBS consente di ricavare informazioni sulla composizione elementare di un materiale, indipendentemente dal suo stato fisico; una sua possibile applicazione pratica nell'ambito della tematica discussa in questo testo potrebbe essere la determinazione qualitativa e semiquantitativa, anche "in situ", dei "metalli pesanti" in un'area contaminata. Un'altra tecnica che verrà illustrata, che ha già avuto rilevanti applicazioni, è basata sulla spettroscopia di riflettanza ed è conosciuta con gli acronimi AVIRIS (Airborne Visible/Infrared Imaging Spectrometer), per la strumentazione utilizzata negli studi di "remote sensing" su larga scala, e SWIRS (Short Wave Infrared Reflectance Spectrometry), per quella impiegata direttamente sul campo. L'utilità della spettroscopia di riflettanza consiste nella possibilità di individuare le specie mineralogiche costituenti un materiale, permettendo, ad esempio, di svolgere rapide classificazioni mineralogiche di massima in siti minerari dimessi.

La terza tecnica discussa sarà la spettrofotometria basata su fluorescenza a raggi-X (XRF), anch'essa oggi disponibile in versione portatile, che consente di effettuare rapidamente analisi non distruttive sulla composizione del campione.

In ultimo sarà dato un breve accenno a tecniche di laboratorio ormai consolidate, la microscopia elettronica a scansione accoppiata a microsonda elettronica (EDS-SEM) ed il Laser-Ablation-ICP-MS (LA-ICP-MS), che, integrando ed approfondendo le informazioni ottenute in campo, consentono di completare la caratterizzazione chimica-mineralogica del sito indagato.

4.1. Principi di funzionamento e possibilità applicative della tecnica LIBS

I componenti principali di un sistema LIBS sono un puntatore laser (nel caso descritto di seguito di tipo Nd:YAG), deputato alla generazione del segnale analitico, ed uno spettrometro necessario alla sua elaborazione ed interpretazione (Figura 1).

Il laser, focalizzato sul campione con un impulso di circa 7 ns e lunghezza d'onda di 1064 nm, ed applicato su una superficie di alcuni µm, produce l'ablazione di un piccola porzione della matrice (nell'ordine di ng o pg) e la contemporanea formazione di un plasma di breve durata. All'interno del plasma il materiale ablato viene convertito in atomi e ioni eccitati; al termine dell'impulso laser il plasma si raffredda espandendosi, e le specie eccitate tornano ad uno stato energetico più basso emettendo una radiazione caratteristica. Questa radiazione, raccolta da un apparato a fibre ottiche, viene analizzata dallo spettrometro nell'intervallo 200-980 nm ed è indice della composizione del materiale indagato. Un esempio di spettro LIBS, riferito al ferro, è rappresentato in Figura 2.

Ciò che rende il LIBS una tecnica particolarmente versatile in ambito geochimico è l'esistenza di sistemi appositamente progettati per il lavoro in campo, dotati ad esempio di puntatori laser e fibre ottiche specifici anche per l'immersione in acqua o per lavorare fino a 50 m di distanza dall'operatore. Grazie a questi accorgimenti il LIBS può operare agilmente in siti contaminati e su ogni tipo di campione (solido, liquido o anche gassoso). I sistemi LIBS da laboratorio, pur essendo meno versatili rispetto a quelli da campo, hanno l'indubbio vantaggio di essere provvisti di una cella di ablazione in cui alloggiare il campione; essa, essendo attraversata da un gas inerte, consente di ottenere un segnale meno disturbato dai rumori di fondo e da eventuali interferenze.



Figura 1. Schema generale di un sistema LIBS (da Capitelli et al., 2002. Modificato).



Figura 2. Spettro LIBS del ferro (da Capitelli et al., 2002. Modificato).

Un apparato LIBS può essere impiegato sia per svolgere analisi qualitative sia per eseguire analisi quantitative. L'analisi qualitativa è principalmente rivolta alla descrizione della composizione elementare del materiale costituente il campione, ottenibile dallo studio delle frequenze emesse nell'ambito dell'intera banda spettrale di lavoro dello strumento (200-980 nm). Nelle analisi quantitative, invece, è fondamentale la disponibilità di materiali certificati con una matrice il più possibile simile a quella del campione. Proprio la scarsità di materiali di riferimento certificati ha finora limitato la diffusione del LIBS e l'utilizzo direttamente in campo per le analisi quantitative. Per superare questa limitazione è stato recentemente introdotto il cosiddetto criterio "calibration-free", un algoritmo di elaborazione matematica dei segnali che consente di effettuare analisi quantitative su campioni solidi senza l'ausilio di curve di calibrazione (Colao *et al.*, 2004); esso si basa sull'assunzione che nel plasma sussistono condizioni di ablazione stechiometrica ed un equilibrio locale termodinamico, in modo da stabilire una relazione tra abbondanza degli analiti, densità di elettroni liberi e temperatura del plasma.

Per le analisi quantitative, al momento, i limiti di rilevabilità del LIBS sono nell'ordine delle decine di mg/kg, limitazione che ne restringe l'applicabilità agli elementi maggiori e, per i metalli pesanti, a quelle situazioni in cui gli analiti superano i 100 mg/kg. Poiché queste concentrazioni sono di solito tipiche delle aree minerarie dismesse, il LIBS può costituire un valido strumento da campo nel loro studio.

Le opportunità della tecnica LIBS sono estremamente ampie e vanno dai settori delle scienze geologiche, a quelli delle scienze dei materiali, delle scienze aerospaziali e della conservazione dei beni culturali. Nell'ambito delle scienze della terra i centri ricerche dell'ENEA hanno già sperimentato numerose applicazioni su differenti matrici ambientali (Ciucci *et al.*, 1996; Barbini *et al.*, 1999; Capitelli *et al.*, 2002; Barbini *et al.*, 2002).

4.2. Principi di funzionamento e possibilità applicative della spettroscopia di riflettanza

La spettroscopia di riflettanza si basa sul principio secondo cui ogni materiale, naturale o artificiale, assorbe e riflette la radiazione elettromagnetica incidente in corrispondenza di specifiche lunghezze d'onda (a loro volta relazionate alla composizione chimica del materiale). La conoscenza delle porzioni dello spettro in cui un dato materiale assorbe/riflette la radiazione permetterà quindi di riconoscerlo ed identificarlo.

Le misure dello spettro di radiazione riflessa rilevanti dal punto di vista del monitoraggio geochimico sono essenzialmente riconducibili alle tecniche AVIRIS e SWIR. Ciò che distingue le due metodiche è principalmente la banda spettrale esaminata.

4.2.1 Spettroscopia di riflettanza AVIRIS

La tecnologia AVIRIS (Airborne Visible/Infra-Red Imaging Spectrometer) opera nella regione visibile/infrarosso, nell'intervallo 400-2500 nm, e misura la

riflessione della radiazione solare. Nata per scopi militari, è oggi utilizzata in studi atmosferici, glaciologici, geologici ed oceanografici. La strumentazione AVIRIS comprende 224 differenti rivelatori, ciascuno operante in un preciso intervallo di lunghezze d'onda (detto banda spettrale), che nel complesso permettono di coprire l'intero intervallo spettrale di misura. Una raccolta di esempi di spettri di riflettanza è riportata in Figura 3.



Figura 3. Esempio di spettro acquisito con AVIRIS (Immagine tratta da: http://speclab.cr.usgs.gov/ con autorizzazione di USGS - Modificata)

Gli spettri della radiazione solare riflessa dalla superficie terrestre vengono acquisiti da aeromobili e consentono di eseguire la mappatura dei materiali distribuiti sul territorio o di svolgere indagini speditive al fine di individuare i siti di campionamento per eventuali indagini di campo e di laboratorio più approfondite. La mappatura risultante da una sessione AVIRIS è costituita da un insieme di "pixel": ogni pixel identifica (o per meglio dire "copre") una porzione dell'area investigata ed è associato allo spettro di riflessione acquisito in tale regione. L'estensione dei pixel dipende dalla quota di volo del velivolo su cui è montato l'apparato AVIRIS; per le due quote più comunemente usate, 20 km e 4 km, ogni pixel copre rispettivamente un'area di 20 m x 20 m e di 4 m x 4 m. In Figura 4 è riportato un esempio di mappatura di minerali eseguita con la tecnica AVIRIS presso il distretto minerario Cuprite (Nevada, USA).

Una mappatura AVIRIS non è tuttavia sempre immediatamente utilizzabile a fini geologici o mineralogici. Oltre ai minerali, infatti, gli spettri di riflessione acquisiti includono generalmente anche vegetazione, acqua, ghiaccio, neve, materiali prodotti dall'uomo, perciò necessitano di una fase di elaborazione ed interpreta-



Figura 4. Esempio di mappatura mineralogica AVIRIS (Immagine tratta da: http://speclab.cr.usgs.gov/ con autorizzazione di USGS)

zione (basata sul confronto degli spettri risultanti con quelli di riferimento ottenuti su materiali noti).

— 135 —

Un esempio di elaborazione di spettri AVIRIS è riportato in Figura 5, dove è rappresentata la distribuzione dei minerali di ferro in un ammasso di rifiuti minerari. Si nota una zona centrale caratterizzata da pirite, posizionata nella cima dell'ammasso, e successive zone concentriche contraddistinte dai minerali secondari derivanti dalla sua alterazione. La scala cromatica utilizzata in questa immagine, oltre a contrassegnare i minerali, illustra inoltre il pH dei drenaggi associati alle varie zone (ad esempio la massima acidità si riscontra nei drenaggi derivanti dall'ossidazione della pirite) ed il conseguente grado di mobilità dei metalli (dipendente in parte proprio dal pH).



4.2.2 Spettroscopia di riflettanza SWIR

Le tecniche SWIR (Short Wave Infrared) operano invece nell'intervallo di lunghezza d'onda 1300-2500 nm. Lo studio di questa regione spettrale è diagnostico della presenza di minerali che contengono particolari molecole o radicali: H₂O, OH, NH₃, CO₃, SO₄ e associazioni di "cationi-OH" quali Fe-OH, Al-OH, Mg-OH.

Strumentazioni SWIR da campo sono già disponibili commercialmente. Tra le principali è possibile includere GER-IRIS (prodotta dalla Geophysical Environmental Research), ASD-FieldSpec (dell'Analytical Spectral Devices) e PIMA (prodotta dalla Integrated Spectronics) (Thompson et al., 1999).

Gli spettrometri GER-IRIS ed ASD-FieldSpec misurano la riflessione della radiazione solare. Il PIMA, invece, si differenzia dai precedenti in quanto misura la riflessione della radiazione emessa da un'apposita lampada integrata nello strumento; in questo caso il campione viene posto a diretto contatto con la testa dello strumento (per evitare dispersione della radiazione generata dalla lampada) e lo spettrometro acquisisce il segnale della radiazione riflessa (Kruse, 1996).

Dall'analisi degli spettri così ricavati è possibile identificare delle porzioni utilizzabili come bande di assorbimento diagnostiche: la jarosite, ad esempio, ha assorbimenti diagnostici a 2270 nm per la specie Fe-OH ed a 1475nm e 1800nm per l'OH. L'identificazione dei minerali si basa sul confronto, in termini di lunghezza d'onda, della forma ed intensità delle bande di assorbimento. Esempi di spettri SWIR per alcuni minerali sono riportati in Figura 6. La profondità delle bande può essere inoltre utilizzata a fini semiquantitativi per valutare l'abbondanza del minerale. Il software associato allo strumento permette il riconoscimento automatico dei minerali attraverso il confronto con spettri di riferimento ottenuti su materiali puri ed archiviati nel relativo database. Nel caso della contemporanea presenza sullo stesso spettro di più caratteristiche diagnostiche relative a minerali diversi, cosa comune nei campioni ambientali, è possibile la determinazione tramite confronto con misure sperimentali su miscele di minerali preparate in laboratorio. Inoltre sono possibili elaborazioni che richiedono simulazioni virtuali ottenute tramite software.

4.3. Spettrofotometria XRF

Le analisi in spettrofotometria XRF si basano sulla lettura della radiazione X secondaria (radiazione di fluorescenza) emessa da un campione esposto a raggi X.

La sorgente dei raggi X può essere costituita, in base alla tipologia di strumentazione adoperata, da un "tubo-X" o da un "radioisotopo".

Quando un materiale viene bombardato dai raggi X gli atomi esposti alla radiazione possono ionizzarsi, attraverso l'espulsione di elettroni dagli orbitali più interni, assumendo però una struttura elettronica instabile; questa lacuna verrà colmata da elettroni localizzati negli orbitali esterni, che "salteranno" nelle posizioni più interne rimaste vuote ed emetteranno una radiazione X caratteristica. Lo studio



Figura 6. Esempi di spettri SWIR per alcuni minerali

(Immagine tratta da: http://www.intspec.com/ con autorizzazione di Integrated Spectronics Ltd - Modificata)

di questa radiazione sarà indicativa degli elementi presenti nel campione e della loro concentrazione.

L'applicabilità della spettrofotometria XRF direttamente in campo è garantita, come per le tecniche viste in precedenza, dalla disponibilità di strumentazione portatile.

Esistono numerosi modelli di analizzatori XRF portatili. Una review è stata realizzata dalla US-EPA (United States- Environmental Protection Agency), consultabile all'indirizzo internet http://www.epa.gov/etv/verifications/vcenter1-18.html. I vari modelli attualmente disponibili sono in grado di effettuare analisi multielementari, consentendo quindi rapide determinazioni dei metalli pesanti presenti nel materiale studiato. Nel caso di strumenti XRF che utilizzano come sorgente X un radioisotopo, gli analiti identificabili dipendono dall'elemento usato per generare i raggi-X. Il cobalto 57, ad esempio, permette di determinare il piombo; il ferro 55 consente di individuare calcio, cromo, potassio, zolfo, titanio, vanadio; il cadmio 109 è invece utile per determinare arsenico, cromo, cobalto, rame, ferro, piombo, manganese, mercurio, molibdeno, nichel, plutonio, rubidio, selenio, stronzio, uranio, vanadio, zinco e zirconio; l'americio 241 è utilizzato per la determinazione di

— 137 —

antimonio, bario, cadmio, argento e stagno. Gli strumenti da campo utilizzano in genere due radioisotopi, quindi due sorgenti X, per ampliare il numero di analiti determinabili.

Ancora una volta, ovviamente, la possibilità di effettuare analisi quantitative dipende dalla disponibilità di spettri X di riferimento ottenuti su campioni dalla composizione nota.

4.4. Altre tecniche analitiche applicabili ad indagini geochimiche

Tecniche analitiche da laboratorio, quali EDS-SEM e Laser-Ablation-ICP-MS (LA-ICP-MS), permettono di approfondire le interpretazioni preliminari eseguite con le strumentazioni da campo appena illustrate.

Ricorrendo al'EDS-SEM, infatti, è possibile verificare ed integrare le informazioni sulla caratterizzazione mineralogica dei campioni acquisite in campo. Trattandosi di una tecnica basata su microscopia, le analisi mineralogiche offrono una maggiore risoluzione e la possibilità, quindi, di caratterizzare singoli granuli. La Figura 7 mostra un esempio di analisi EDS-SEM relativa all'identificazione di un granulo di plumbojarosite.

Allo stesso modo, le informazioni relative alla composizione elementare dei campioni possono essere integrate con il Laser-Ablation-ICP-MS, il quale offre limiti di rilevabilità nettamente migliori. Il campione, inserito nell'apposita cella di ablazione, viene colpito da un impulso laser che genera così un aerosol di finissime particelle solide; quest'ultime vengono veicolate da un flusso di gas inerte all'interno di un plasma, dove gli elementi costituenti saranno ionizzati ed infine quantificati da uno spettrometro di massa. Il LA-ICP-MS può essere usato a fini qualitativi e quantitativi; in quest'ultimo caso è fondamentale avere a disposizione un materiale certificato omogeneo, con matrice affine al campione, per effettuare la fase di calibrazione. La Figura 8 illustra un esempio di analisi qualitativa LA-ICP-MS su un campione di suolo di un'area mineraria, volta ad effettuare una valutazione preliminare della distribuzione di alcuni elementi nei granuli costituenti il campione; è possibile notare come l'andamento di ferro ed arsenico sia in buona correlazione, ad indicare un'associazione tra i due elementi nel campione.

Un LA-ICP-MS può anche operare in modalità depth-profile, ossia è in grado di eseguire "analisi di profondità". In questo caso, infatti, il puntatore laser rimane fisso nello stesso punto, mentre la cella di ablazione viene traslata verticalmente in modo che il laser possa ablare il campione in profondità. Ricorrendo al depth-profile è possibile studiare la composizione elementare del campione, in un preciso punto (quindi anche su un singolo granulo nel caso di materiale sciolto come il suolo), scendendo progressivamente al suo interno. Un'applicazione della modalità depth-profile è mostrata nella Figura 9, dove tre diversi granuli di un suolo di miniera sono stati esaminati uno dopo l'altro in profondità; si nota che il piombo è principalmente distribuito sulla superficie dei granuli mentre la sua presenza diminuisce approfondendosi nei granuli.



— 139 —

1.20 2.20 3.20 4.20 5.20 6.20 7.20 8.20 9.20 10.2



Figura 7. Esempio di indagine SEM (individuazione di Plumbojarosite).

5. Valutazione geochimica della mobilità dei metalli pesanti

Gran parte degli scarti delle attività estrattive sono generalmente abbandonati in ambiente subaereo, in condizioni che possono favorire l'ossidazione dei solfuri e la conseguente formazione di drenaggi acidi in grado, a loro volta, di indurre la mobilità dei metalli. Da questo punto di vista occorre considerare l'influenza esercitata dalle soluzioni acide circolanti nei siti minerari, in quanto proprio alla loro azione ed all'ossidazione dei solfuri di ferro è legata la dissoluzione dei solfati di ferro solubili e la dissoluzione dei solfati di ferro poco solubili della serie alunite/jarosite (Lapakko, 2002).

La mobilità dei metalli non è funzione del contenuto totale ma, in matrici complesse come quelle ambientali, dipende sostanzialmente dalla frazione mineralogica a cui gli elementi sono associati. Un utile approccio metodologico per valutare questa "speciazione" è rappresentato dai protocolli di estrazione sequenziale, che consentono appunto di determinare a quali fasi mineralogiche, ed in che quan-



Figura 8. Esempio di scansione LA-ICP-MS. L'intensità di segnale è proporzionale alla presenza dell'elemento nel campione.

tità, i metalli studiati sono presenti nel campione. Anche se concepite originariamente per lo studio della speciazione dei metalli nei sedimenti (Tessier *et al.*, 1979) questi protocolli possono essere impiegati nelle aree di accumulo degli scarti minerari per determinare il loro effetto a breve e lungo termine sull'ambiente (Leinz *et al.*, 2000).

Esistono numerosi schemi di estrazione sequenziale, ognuno caratterizzato dall'impiego di una peculiare serie di reagenti (estraenti) selezionati per la loro capacità di agire su una precisa componente della matrice del campione. Dal momento che i vari estraenti vengono messi a reagire con il campione in successione (ad ogni reagente corrisponde infatti un cosiddetto "step") ne consegue che le aliquote di



Figura 9. Esempio di analisi LA-ICP-MS. L'immagine a destra mostra l'analisi di tre singoli granuli di quarzo in modalità "depth-profile".

metalli estratte nel primo step sono quelle in teoria più mobili, mentre quelle estratte negli step successivi sono via via meno mobili. Tuttavia, poiché molti protocolli di estrazione sequenziale sono stati applicati a casi studio particolari, si è assistito nel tempo ad una notevole diversificazione di procedure contraddistinte dall'utilizzo di "estraenti" sempre più specifici. Inoltre, la variabilità delle condizione operative, anche quando sono impiegati gli stessi estraesti, rende difficoltoso comparare i risultati ottenuti da studi diversi; ad esempio, le varie modalità di conservazione e pretrattamento dei campioni (quali congelamento, essiccazione, ecc.) possono comportare alterazioni nella speciazione dei metalli nei campioni. Da qui è nata l'esigenza di adottare uno schema di estrazione sequenziale semplificato, altamente standardizzato, capace di garantire la comparazione dei dati; tale obiettivo è stato raggiunto con la definizione, da parte della Community Bureau of Reference (BCR) della Commissione Europea, di un protocollo di estrazione articolato in tre step (tabella 2) e con la produzione di un apposito materiale certificato di riferimento (per validare, in termini di accuratezza e precisione, la corretta applicazione del suddetto schema).

| STEP | ESTRAENTE |
|--|--|
| A : Frazione facilmente scambiabile/carbonatica | CH ₃ COOH (0.11M) |
| B : Frazione facilmente riducibile (legata agli ossidi di Fe e Mn) | NH ₂ OH*HCl (0.5M) |
| C : Frazione ossidabile (legata alla sostanza organica ed ai solfuri) | Estrazione con H_2O_2 (8.8M) e con CH_3COONH_4 (1M a pH=2) |
| Frazione residuale | HNO ₃ , H ₂ O ₂ , HF |

Tabella 2 – Protocollo di estrazione sequenziale BCR a tre steps.

Il protocollo di estrazione BCR prende in esame i tre raggruppamenti di frazioni mineralogiche più rappresentativi (carbonati, ossidi e idrossidi di Fe e Mn, solfuri); inoltre, il residuo rimanente al termine dell'ultimo step viene sottoposto a dissoluzione acida per determinare le quantità di metalli con il minore grado di mobilità. Al tempo stesso, però, lo schema BCR è criticato per il numero limitato di step, che non permette una dettagliata separazione delle varie fasi mineralogiche. Per questo motivo sono ancora ampiamente utilizzati protocolli di estrazione sequenziale con un numero maggiore di steps, anche fino ad otto, sebbene non siano ancora ufficializzati e/o standardizzati. Esempi di schemi di estrazione alternativi (Dold, 2003) sono riportati nelle tabelle 3 e 4.

Più in generale, i limiti insiti nell'applicazione delle procedure di estrazione sequenziale sono i tempi lunghi, la dipendenza dalla selettività e forza ionica degli estraesti, la variazione del potenziale redox causata dalla manipolazione del campione, la solubilizzazione (sia pure parziale) di metalli legati a fasi solide che si vorrebbero lasciare indisciolte, il verificarsi di fenomeni di riadsorbimento e ridistribuzione fra le fasi.

Un criterio alternativo per la valutazione della mobilità dei metalli è rappresentato dai test di lisciviazione mediante approccio cinetico. A differenza delle estrazioni sequenziali, in questo caso si utilizza un solo estraente; aliquote omogenee dello stesso campione vengono infatti messe a reagire, separatamente, con la medesima soluzione estraente ma per un tempo sempre diverso e standardizzato

| — | 143 | |
|---|-----|--|
|---|-----|--|

| STEP | ESTRAENTE | | | |
|--|---|--|--|--|
| A : Frazione scambiabile | CH_3COONH_4 (1M a pH=4.5) | | | |
| B : Frazione adsorbita, carbonatica | CH ₃ COONa (1M a pH=5) | | | |
| C : Ossidi di Mn | $NH_2OH^*HCl (0.1M \text{ a pH}=2)$ | | | |
| D : Ossidi di Fe(III) | $NH_4OCOCOONH_4 * H_2O (0.1M pH=3.3)$ in "Bagno Maria" a 80° per 2 ore | | | |
| E : Sostanza organica e solfuri | H_2O_2 (35%) in "Bagno Maria" per 1 ora | | | |
| Frazione residuale | HNO_3 , H_2O_2 , HF | | | |

Tabella 3 - Protocolli di estrazione sequenziale alternativi (Dold, 2003).

| STEP | ESTRAENTE | | | |
|---|---|--|--|--|
| A : Frazione solubile | H ₂ O | | | |
| B : Frazione scambiabile | CH_3COONH_4 (1M a pH=4.5) | | | |
| C : Ossi-idrossidi di Fe(III) | $NH_4OCOCOONH_4 * H_2O (0.2M pH=3)$ | | | |
| D : Ossidi di Fe(III) | $NH_4OCOCOONH_4 * H_2O (0.2M pH=3)$ in "Bagno Maria" a 80° per 2 ore | | | |
| E : Sostanza organica e solfuri secondaridi Cu | H_2O_2 (35%) in "Bagno Maria" per 1 ora | | | |
| F : Solfuri primari | Combinazione di KClO ₃ e HCl poi HNO ₃ (4M) | | | |
| Frazione residuale | HNO ₃ , H ₂ O ₂ , HF | | | |

Tabella 4 - Protocolli di estrazione sequenziale alternativi (Dold, 2003).

(da alcuni minuti ad oltre 48 ore). Tipici estraenti utilizzati nei test cinetici sono l'EDTA (0,05M a pH=6,5) o l'Acido Acetico (0,43M). Tuttavia, la scelta del reagente dipende dall'informazione cercata così come dal tipo e/o grado di contaminazione della matrice da studiare. L'acido acetico, ad esempio, estrae principalmente i metalli presenti in forma ionica associati alla frazione carbonatica ed a quella scambiabile, mentre l'EDTA complessa sia i metalli presenti nella frazione scambiabile sia quelli legati alla frazione organica ed agli ossi-idrossidi amorfi.

L'utilizzo in un test cinetico di un estraente "debole" come l'acido acetico può essere utile per lo studio di matrici ambientali con un elevato grado di contaminazione o quando si vuole determinare solo la frazione più facilmente estraibile. I test cinetici descrivono quindi una relazione tra metallo estratto e tempo, per cui i risultati possono essere modellizzati matematicamente con una funzione del tipo:

$$Y = a (1-e^{-k_1t}) + b (1-e^{-k_2t}) + \dots + n (1-e^{-k_nt})$$

dove a,b,...,n rappresentano le singole frazioni del metallo estratte, k1,k2,...,kn sono le costanti cinetiche associate, e Y è la quantità totale di metallo estratta al tempo t. Generalmente, per semplicità di rappresentazione ed elaborazione, si considerano solo due frazioni, definite rispettivamente "labile" e "moderatamente labile", ed una funzione ad una o due costanti cinetiche (calcolate per regressione non lineare) del tipo:

$$Y = a + b (1 - e^{-k2t})$$

per un modello con una costante cinetica, mentre la funzione sarà:

$$Y = a (1 - e^{-k_1 t}) + b (1 - e^{-k_2 t})$$

per un modello con due costanti cinetiche.

La preferenza di uno dei due modelli dipende dalla velocità di lisciviazione: ad elevate velocità di lisciviazione della frazione labile, la costante k1 assume valori elevati (k1>>k2) e l'andamento della cinetica è descritto in modo più preciso dai modelli ad un componente (Brunori *et al.*, 2005).

Un vantaggio dell'approccio cinetico è sicuramente legato alla rapidità di esecuzione ed alla minore suscettibilità ad errori dipendenti dall'operatore. Nelle estrazioni sequenziali, difatti, si ha la necessità di "manipolare" il campione residuo al termine di ogni step, per separarlo dalla fase liquida costituita dall'estraente e dalle specie portate in soluzione prima di sottoporlo al reagente successivo. Ciò può comportare perdite di campione. Tuttavia occorre ricordare che nell'approccio cinetico le quantità di metallo estratte non sono strettamente riconducibili a specifiche frazioni mineralogiche, come invece avviene, più o meno dettagliatamente, in base al protocollo adottato, facendo uso delle estrazioni sequenziali.

Riassumendo, nelle estrazioni sequenziali l'attenzione è posta sulla specificità degli estraesti utilizzati e sulla discriminazione delle frazioni mineralogiche, mentre nei metodi cinetici si utilizza un estraente con buona capacità complessante e relativa aspecificità per concentrare l'attenzione sull'evoluzione temporale della mobilizzazione dei metalli e sui modelli matematici che meglio approssimano tale dinamica.

A titolo di raffronto, in Figura 10 sono riportati due esempi di studio della mobilità di metalli, rispettivamente relativi a zinco e cobalto, ottenuti su uno stesso campione di suolo di miniera ed applicando sia l'approccio cinetico sia l'estrazione sequenziale BCR. Si può subito notare che la percentuale "estraibile" di Zn, corrispondente circa al 23% del totale in base all'estrazione BCR, è immediatamente estratta dopo meno di un ora di applicazione del metodo cinetico; successivamente



— 145 —

Figura 10. Applicazione del metodo cinetico e sequenziale su un suolo di miniera.

si raggiunge una situazione di sostanziale equilibrio. Per il cobalto la percentuale estraibile è nettamente maggiore (> 70%), ma l'equilibrio è raggiunto più lentamente (circa 20 ore).

Dai risultati delle estrazioni sequenziali, inoltre, si evidenzia che circa l'80% dello zinco rimane nel residuo, mentre la somma dei valori dei parametri a e b dell'equazione cinetica, circa il 20% del totale, può correlarsi con la frazione facilmente estraibile. Nel grafico quanto appena detto è rappresentato dalla porzione iniziale più ripida della curva.

Il cobalto evidenzia invece una maggiore mobilità iniziale; infatti la somma di a e b dell'equazione cinetica risulta maggiore del 50% del contenuto totale, con un 20% più facilmente estraibile ed un 30% che viene estratto in tempi più lunghi, mentre la frazione residuale è circa il 30%.

6. Il trattamento dei suoli contaminati

Nell'ambito dell'attività che l'ENEA svolge per il trattamento ed il recupero dei suoli contaminati da metalli pesanti verranno illustrati brevemente due aspetti applicativi, sui quali il gruppo afferente agli autori, ACS-CHIM, ha svolto attività di ricerca negli ultimi due anni.

A) Utilizzo di ammendanti per la riduzione della mobilità di metalli pesanti in siti contaminati.

Una promettente strategia per il recupero di aree contaminate da metalli pesanti consiste nell'impiego di materiale ad azione "metallo bloccante" da miscelare al suolo inquinato; posseggono la suddetta capacità, ad esempio, il carbonato di calcio, la fosforite, le zeoliti, i "fanghi rossi", gli ossidi di ferro.

La ricerca di materiali utili a questo scopo si lega in alcuni casi ad un'altra attuale tematica ambientale, ossia quella relativa allo smaltimento dei rifiuti. Particolarmente interessanti, infatti, sono le possibilità offerte dai fanghi rossi, residui della lavorazione della bauxite che, oltre a possedere proprietà metallo-bloccanti, fungono anche da efficienti ammendanti contribuendo a migliorare la struttura fisica del suolo.

L'attività scientifica dell'ENEA ha sperimentato proprio i fanghi rossi, prodotti dalla tecnologia Bauxol®, in abbinamento con "compost", derivato dalla decomposizione ed umificazione della frazione organica selezionata dei rifiuti solidi urbani, per il trattamento di campioni di suolo prelevati dall'area mineraria ormai in disuso dei monti della Tolfa.

Considerando che i suoli in prossimità delle zone minerarie sono in generale caratterizzati da condizioni chimico-fisiche estreme, riassumibili in:

- pH acido o sub-acido
- scarsità di sostanza organica
- mancanza di struttura
- elevata concentrazione di metalli tossici

la scelta di unire compost e fanghi rossi è stata quindi dettata proprio dalla necessità di intervenire positivamente su tutti questi parametri. I fanghi rossi, in quanto caratterizzati da pH basico (~9), da granulometria affine all'argilla e da capacità metallo-bloccante, possono infatti contribuire a tamponare/neutralizzare il grado di reazione del suolo, a migliorare la struttura ed a ridurre la mobilità dei metalli. Il compost, similmente, essendo ricco in sostanza organica (di cui il 20% circa in forma umificata), può contribuire a ristabilire la fertilità e la struttura del suolo.

Questi presupposti sono stati successivamente verificati eseguendo delle prove di semina di orzo su cinque porzioni di suolo di miniera variamente miscelato ai due ammendanti presi in esame:

- Prova A: 100% Suolo miniera abbandonata
- Prova B: 80% Suolo miniera + 20% Bauxsol
- Prova C: 80% Suolo miniera + 10% Bauxsol + 10% compost
- Prova D: 80% Suolo miniera + 20% compost
- Prova E: 60% Suolo miniera + 20% Bauxsol + 20% compost

Come riferimento è stata eseguita un'ulteriore semina di orzo (Prova F) su comune terriccio da vivaio.

I primi risultati (la sperimentazione è attualmente ancora in corso) hanno dimostrato l'effetto positivo degli ammendanti. La Figura 11 mostra i risultati ottenuti per le prove A,B,C,F: mentre la crescita di orzo sul suolo di miniera non trattato (A) non ha avuto successo, la semplice aggiunta di fanghi rossi ha determinato un evidente miglioramento nello sviluppo dell'apparato radicale (B); la presenza di compost (C) ha poi consentito uno sviluppo della piantina di orzo comparabile a quello ricavato sul terriccio di riferimento (F).



Figura 11. Crescita di orzo su suolo di miniera addizionato con ammendanti.

B) Siti contaminati come fonte di Biodiversità Microbica per applicazioni nella "bioremediation"

I siti industriali ospitano spesso biotopi particolari, sviluppatisi in risposta alle difficili condizioni ambientali, determinate dalla presenza di inquinanti. Tali siti rappresentano al tempo stesso aree ad elevato rischio ambientale ed una attrattiva fonte di materiale di studio. All'interno di questi biotopi i microorganismi, grazie alla loro plasticità genetica e versatilità metabolica, riescono ad adattarsi in pochi anni a cambiamenti che a piante e ad animali richiederebbero tempi geologici. I sistemi di adattamento sviluppati dai microorganismi nativi di questi siti sono di interesse sia per gli studi biologici sulla risposta cellulare allo stress, sia per le applicazioni biotecnologiche che ne possono derivare, in particolare nel campo del biorisanamento. Di solito il biorisanamento viene utilizzato per la degradazione di composti organici; in alcuni casi, però, la contemporanea presenza di altri inquinanti dotati di tossicità verso la componente batterica già presente o aggiunta al suolo, può inibirne la capacità degradativa, impedendo l'impiego dei microrganismi nel processo di bonifica (Sandrin and Maier, 2003). Si pone così la necessità di isolare nuovi microorganismi con vie metaboliche che permettano di superare i colli di bottiglia costituiti dai processi biodegradativi, quali, ad esempio, la degradazione di inquinanti organici in presenza di metalli pesanti.

La possibilità di utilizzare i microorganismi per processi di biorisanamento è ormai una realtà sempre più praticata nel campo del risanamento di acque, suoli e sedimenti anche se esistono ancora molti punti critici su cui è necessario un ulteriore sforzo di R&S. Uno di essi è, ad esempio, la biodisponibilità degli inquinanti per i sistemi microbici che rappresenta anche il maggior fattore limitante del biorisanamento.

Il trattamento ottimale dei vari contaminanti richiede tuttavia organismi altamente specializzati in quanto le condizioni di un sito contaminato possono essere tossiche anche per gli organismi comunemente impiegati nella bioremediation. Organismi con queste caratteristiche si possono ottenere dall'ingegneria genetica o dallo studio ecologico degli stessi siti contaminati (ad esempio le miniere abbandonate). Quest'ultimi, infatti, possono costituire nuove nicchie ecologiche dove isolare organismi che hanno sviluppato un metabolismo compatibile alla sovraesposizione da specifici metalli. La biodiversità microbica autoctona di queste aree rappresenta una potenziale soluzione per il risanamento delle aree stesse.

Sotto questo aspetto è importante sottolineare che la biodiversità delle aree contaminate ha uguale significato delle aree protette e degli ambienti naturali estremi (Convention on Biological Diversity 2002, Montreal).

B.1) Il ruolo della componente microbiologica nella mobilità dei metalli nel suolo

Il termine "biodegradazione", come già accennato, può sembrare improprio se riferito ai metalli pesanti, dal momento che nessun processo può degradare gli elementi inorganici (Barkay and Schaefer, 2001); la "condizione" di questi elementi però può essere alterata dalla componente biotica (in particolare dai microrganismi) attraverso diversi processi che ne influenzano la mobilità, la reattività e la biodisponibilità.

Generalmente, esistono sei tipi di interazione (uno passivo, gli altri metabolismo-dipendenti) che possono verificarsi quando un microrganismo viene in contatto con un metallo (Figura 12):

1. i metalli si legano (in maniera non covalente) alla superficie esterna della cellula (bioassorbimento): è un processo passivo, indipendente dal metabolismo della cellula;



Figura 12. Meccanismi di interazione tra microrganismo e metalli pesanti.

- 2. i metalli solubili vengono trasportati attivamente attraverso la membrana cellulare e accumulati all'interno della cellula (bioaccumulo);
- i metalli vengono ridotti o ossidati da reazioni redox, diventando più o meno mobili;
- 4. alcuni metalli possono essere metilati, diventando più mobili;
- 5. i microrganismi secernono acidi che alterano la mobilità del metallo (acidolisi);
- 6. i microrganismi producono agenti chelanti che complessano il metallo rendendolo più o meno mobile (chelazione).

In condizioni ambientali appropriate, i metalli contenuti nelle frazioni superficiali dell'ecosistema possono essere "solubilizzati" dall'azione di batteri e funghi. Come conseguenza, il bioleaching rappresenta un potenziale pericolo per l'ambiente nei suoli contaminati da metalli pesanti e negli scarti di miniera. Studi condotti su batteri zolfo- e ferro-ossidanti del genere Thiobacillus su terreni inquinati da metalli pesanti, hanno dimostrato la capacità dei batteri di solubilizzare più del 50% del contenuto di arsenico, cobalto, cromo, nichel, vanadio, cadmio e rame (Gomez and Bosecker, 1999). Allo stesso tempo, gli altri processi (bioaccumulo, riduzione enzimatica, chelazione) hanno trovato applicazioni in campo biotecnologico nella bonifica di sedimenti, terreni e reflui contaminati da metalli pesanti (Eccles, 1999; Malik, 2004) e per il recupero di metalli preziosi (Krebs *et al.*, 1997).

B.2) Studio della resistenza a metalli pesanti, della capacità di bioaccumulo e del profilo metabolico di consorzi batterici isolati nel sito minerario di Ingurtosu, Sardegna.

Fonte del materiale isolato è il sito minerario di Ingurtosu, Sardegna, miniera dismessa di blenda e galena, inserito nel "Piano Prioritario Nazionale per la Bonifica dei Siti Industriali". Sette campioni, raccolti lungo il rio Naracauli, sono stati trattati con procedure di arricchimento ottenendo rispettivamente 7 consorzi microbici (tabella 5), i quali, dopo passaggi in serie a concentrazioni crescenti di Zinco risultano resistenti alla massima concentrazione testata: 40 mM. I consorzi sono stati denominati con la sigla Ing (Ingurtosu), seguita dal numero del campione. Per ogni consorzio è stata saggiata la capacità di accumulare zinco in fase stazionaria della curva di crescita, ottenendo per tutti risultati positivi.

| CAMPIONE | PROVENIENZA | BIOMASSA g/L | ACCUMULO Q = mg Zn/g peso secco | | |
|----------|---------------------|-----------------|------------------------------------|--|--|
| Ing 3 | sedimento umido | 2.0 | 148 | | |
| Ing 5 | sedimento secco | 1.4 | 160 | | |
| Ing 6 | ghiaia fine | 1.6 | 133 | | |
| Ing 7 | rizosfera acquatica | 1.2 | 139 | | |
| Ing 8 | sedimento umido | 1.2 | 132 | | |
| Ing 9 | suolo | 1.2 | 141 | | |
| Ing 10 | sedimento umido | 1.3 | 92 | | |

Tabella 5 – Saggio della capacità di bioaccumulo su consorsi microbici isolati nel sito minerario di Ingurtosu (Sardegna).

I consorzi, cresciuti in presenza di concentrazioni di Zn di 10mM, mostrano coefficienti d'accumulo Q (mg Zn/g peso secco) molto elevati (da 92 a 160). Tali valori sono più elevati di quelli trovati in letteratura per i singoli microrganismi e paragonabili ai migliori dati di bioassorbimento riscontrati nei fanghi attivi (Q=138). Questa caratteristica di iperaccumulatori li rende adatti per varie applicazioni.

Alcuni dei consorzi sono stati successivamente studiati per indagare il meccanismo di accumulo e le strutture cellulari coinvolte. Ad esempio, per il consorzio con il più elevato coefficiente di accumulo, Ing5 (Q=160) è stato studiato mediante analisi in TEM, l'effetto della diversa biodisponibilità di zinco sulle pareti cellulari (Figura 13). Queste appaiono più compatte ed elettrondense al crescere della biodisponibilità dello zinco, soprattutto nei microrganismi filamentosi.

Dai consorzi sono stati quindi isolati i singoli ceppi (circa 30) di cui è stato studiato il profilo metabolico mediante il sistema Biolog 3.5TM identificandone un



— 151 —

Figura 13. Immagine al TEM di microrganismi cresciuti in assenza di Zn (sinistra) e in Zn 35 mM (destra).

numero limitato: Corynebacterium aquaticum A, Corynebacterium ammoniagenes, Alcaligenes xylosoxidans, Cryptococcus luteolus, Bacillus thermoglucosidasius, Bacillus megaterium, Arthrobacter sp, Microbacterium sp. (Figura 14)



Figura 14. Distribuzione dei ceppi identificati tra batteri Gram positivi (GP) e negativi (GN) e lieviti.

B.3) Caratterizzazione microbiologica di due consorzi microbici nativi del sito minerario di Ingurtosu, Sardegna

Successivamente, la ricerca si è focalizzata sull'analisi delle capacità dei microorganismi di resistenza e di accumulo dei metalli pesanti, sia in consorzio che in coltura pura.

I due consorzi (Ing5 e Ing9) sono stati scelti sulla base della elevata capacità di accumulare zinco dimostrata in fase di selezione (rispettivamente 160 e 141mg Zn /g peso secco, in terreno contenente Zn 10 mM). Il consorzio Ing5 è composto da 5 isolati Gram positivi, due bastoncelli (identificati con il 16S rDNA come *Microbacterium sp. e Arthrobacter sp.*) e tre filamentosi di cui non si è ancora trovata

identificazione; il consorzio Ing9 è composto da 5 morfotipi Gram positivi: 2 bastoncelli, uno dei quali identificato come *Bacillus thermoglucosidasius*, e 3 filamentosi non ancora identificati.

Partendo dai risultati ottenuti in fase di selezione, è stata studiata in esperimenti successivi, l'influenza dello zinco sulla curva di crescita a 3 concentrazioni (0.15mM e 10 mM e 35 mM) e la relativa capacità di accumulo nel tempo. I risultati mostrano che lo Zinco stimola la crescita per il consorzio Ing5, mentre riduce sia la velocità che la crescita per Ing9. Per entrambi i consorzi l'accumulo di zinco aumenta all'aumentare della biodisponibilità e diventa significativo a partire dalla concentrazione 10 mM.

L'efficienza di accumulo (Q=mg Zn /g di peso secco) è descritta da una curva che presenta nei primi giorni di crescita valori bassissimi (fase di latenza) e raggiunge il massimo valore in fase stazionaria (Q \cong 150). Questo suggerisce che il principale meccanismo di accumulo richieda un'induzione, che avviene nel periodo corrispondente alla fase iniziale della crescita e sia di tipo attivo, quindi dipendente dal metabolismo.

I due consorzi sono risultati in grado di resistere anche al cadmio (fino a 5 mM) e di accumularlo (38 e 28 mg/g peso secco, rispettivamente Ing5 e Ing9). La capacità di accumulo si è mantenuta sostanzialmente stabile nel tempo: da esperimenti multipli successivi sono stati ottenuti valori ripetibili, per Zn e Cd, con fluttuazioni tra i vari esperimenti non significative.

I singoli isolati di entrambi i consorzi (riportati in tabella 6 con le sigle 5A, 5B, 5C, 5D, 5E per Ing5, e 9Bv, 9B, 9G, 9D, 9H per Ing9) sono stati testati per la resistenza a Zn e Cd anche in coltura pura. Tutti gli isolati risultano resistenti, anche se con soglie di resistenza diverse (tabella 6).

Per gli isolati di Ing5 è stata testata anche la resistenza al Hg: un dato di interesse che emerge per il consorzio Ing5 è come alcuni isolati acquisiscono in consorzio la capacità di vivere a concentrazioni di Cd e Hg più elevate di quelle tollerate

| Ingurtosu 5 | Zn (mM) 40 | Са 1 | l (m 5 | M) 20 | Н 5 | g (µl 25 | M) 50 | Ingurtosu 9 | Zn (mM) 40 | Cd (5 | mM) 20 |
|----------------|---------------|---------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------------|---------------|-----------|-----------|
| 5A | • | • | • | | • | • | • | 9Bv | • | • | |
| 5B | • | • | • | • | • | • | | 9B | • | • | • |
| 5C | • | • | • | • | • | • | • | 9G | • | • | |
| 5D | • | • | • | | • | • | | 9D | • | • | • |
| 5E | • | • | | | • | • | • | 9H | • | • | |
| Consorzio | • | • | ٠ | | • | • | | Consorzio | • | • | |

Tabella 6 - Resistenza ai metalli pesanti degli isolati e dei consorzi Ing5 e Ing9.

in coltura pura. A partire da questi dati, è stato approfondito lo studio sul meccanismo di accumulo e l'attività metabolica del consorzio Ing5 (Sprocati *et al.*, 2005).

Ulteriori lavori condotti nel nostro laboratorio (Sprocati *et al.*, 2006) su consorzi microbici isolati da siti industriali, risultati allo stesso tempo resistenti ai metalli pesanti (Cr⁶⁺, Pb²⁺,Cd²⁺ e Co²⁺) e ottimi biodegradatori di petrolio e diesel, incoraggiano ad approfondire la ricerca su questi consorzi di miniera per verificare se riescano a combinare la resistenza ai metalli con capacità metaboliche di degradazione di inquinanti organici.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

APAT, 2006. Censimento dei siti minerari abbandonati - I siti minerari italiani (1870-2006).

- Barbini R., Colao F., Fantoni R., Palucci A., Capitelli F., 1999. Application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of metals in soils. *Appl. Phys.* A 69: 175-178.
- Barbini R., Colao F., Lazic V., Fantoni R., Palucci A., Angelone M., 2002. On board LIBS analysis of marine sediments collected during the XVI Italian campaign in Antarctica. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 57: 1203-1218.
- Barkay T., Schaefer J., 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Curr Opin Microbiol.* 4: 318-323.
- Convention on Biological Diversity, Montreal 2002, ISBN: 92-807-2172-0.
- Brunori C., Cremisini C., D'Annibale L., Massanisso P., Pinto V., 2005. A cinetic study of trace element leachability from abandoned-mine-polluted soil treated with SS-MSW compost and red mud. Comparison with result from sequential extraction. *Anal. Bioanal Chem.*, 381: 1347-1354.
- Capitelli F., Colao F., Provenzano M.R., Fantoni R., Brunetti G., Senesi N., 2002. Determination of heavy metals in soils by laser induced breakdown spectroscopy. *Goederma* 106: 46-62.
- Cinti D., Angelone M., Masi U., Cremisini C., 2002. Platinum levels in natural and urban soils from Rome and Latium(Italy): significance for pollution by automobile catalytic converter. *The Science of the Total Environment.*, 293: 47-57.
- Ciucci A., Palleschi V., Rastelli S., Barbini R., Fantoni R., Palucci A., Colao F., Ribezzo S., 1996. Trace pollutants analysis in soil by a time-resolved Laser Induced Breakdown Spectroscopy technique. *Appl. Phys.* B 63: 185-190.
- Colao F., Fantoni R., Lazic V., Paolini A., Fabbri F., Ori G.G., Mariangeli L., Baliva A., 2004. Investigation of LIBS feasibility for in situ planetary exploration: An analysis on Martian rock analogues. *Planetary and Space Science* 52: 117-123.
- Dold B., 2003. Speciation of the most soluble phases in a sequential extraction procedure adapted for geochemical studies of copper sulfide mine waste. J. Geochemical Exploration 80: 55-68.
- Eccles H., 1999. Treatment of meta-contaminated wastes. Why select a biological process? *Tibtech* 17: 462-465.
- Gomez and Bosecker, 1999. Leaching of heavy metals from contaminated soils by using Thiobacillus ferrooxidans and T. thiooxidans. *Geomicrobiol. J.* 16: 233-244.
- Krebs et al. 1997. Microbial recovery of metals from solids. FEMS Microbial. Rev. 20: 605-617.
- Kruse F.A., 1996. Identification and mapping of minerals in drill core using hyperspectral image analysis of infrared reflectance spectra. *International Journal of Remote Sensing*, v. 17, no. 9: 1623-1632.
- Lapakko K., 2002. Metal mine rock and waste characterization tools: an overview. Minesota Department of Natural Resources (U.S.).

- Leinz R.W., Sutley S.J., Desborough G.A., Briggs P.H., 2000. An Investigation of the Partitioning of Metals in Mine Wastes Using Sequential Extractions. Proceedings of the International Conference on Acid Rock Drainage (ICARD2000).
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30: 261-278.
 Sandrin T.R., Maier R.M., 2003. Impact of Metals on the Biodegradation of Organic Pollutants. *Environmental Health Perspectives* 111: 1093-1101.
- Sprocati A.R., Alisi C., Tasso F., Segre L., Cremisini C., 2006. Comparison of microbial communities native to three differently polluted ecological niches in the industrial site of Bagnoli (Naples, Italy). In: Recent research developments in multidisciplinary applied microbiology. Wiley-VCH. ISBN 3-527-31611-6
- Sprocati A.R., Alisi C., Segre L., Tasso F., Galletti M., Cremisini C., 2005. Investigating heavy metal resistance, bioaccumulation and metabolic profile of a metallophile microbial consortium native to an abandoned mine. *Science of Total Environment*, 366 (2-3): 649-658.
- Stumm W., Morgan J.J., 1981. Aquatic chemistry An introduction emphasizing chimica equilibria in natural waters. John Wiley & Sons, Inc. 470 p.
- Tessier A., Campbell P. G. C., Bisson M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51: 844-851.
- Thompson A.J.B., Hauff P.L., Robitaille A.J., 1999. Alteration Mapping in Exploration: Application of Short-Wave Infrared (SWIR) Spectroscopy. SEG Newsletter No. 39 October 1999.